

平成22年 5月 11日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20791370
研究課題名（和文） 新しいヘルパーT細胞から解明するシェーグレン症候群の唾液腺における病態発現機序
研究課題名（英文） The pathological roles of Th17 cells in Sjögren's syndrome

研究代表者
酒井 梓（SAKAI AZUSA）
東北大学・病院・医員
研究者番号：90463778

研究成果の概要（和文）：

シェーグレン症候群の下唇小唾液腺におけるIL-18ならびにTh17に関連するサイトカインの発現とその機能を検討した。シェーグレン症候群の唾液腺ではIL-18が発現しており、IL-17を産生するTh17の浸潤を認めた。下唇小唾液腺由来の唾液腺細胞からはIL-18とIL-17の相互作用によりIL-8の産生が誘発され、IL-18およびTh17がシェーグレン症候群の病態発現に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The expression of IL-18 was detected in salivary glands of Sjogren's syndrome. Furthermore, the majority of the infiltrating cells were Th17 cells secreting IL-17. IL-18 amplified the secretion of IL-8 induced by low amounts of IL-17 from primary salivary gland cells. The results suggest that IL-18 and Th17 cells are associated with the pathogenesis of Sjogren's syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：シェーグレン症候群・Th17・IL-18

1. 研究開始当初の背景

(1) 新しいヘルパーT細胞の発見と自己

免疫疾患への関与：

従来、CD4陽性T細胞には細胞性免疫に

関与する1型ヘルパーT(Th1)細胞と、液性免疫に関与する2型ヘルパーT(Th2)細胞が知られており、自己免疫疾患や炎症性疾患においてTh1とTh2のバランスによって疾患の病態が決定されるといわれてきた。しかしながら2003年以降、このTh1/Th2の関与だけでは説明がつかなかったT細胞系の免疫システムを担う、新たな分子が存在するとの報告が相次ぎ、“Th17”と命名された。Th17は、インターロイキン(IL)-17を産生し、IL-17は上皮細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージなどから炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子などの産生を誘導し、アレルギー応答や自己免疫などで中心的な役割を果たしているという画期的な事象が、マウスを用いた実験的自己免疫性脊髄炎やコラーゲン誘発関節炎に関する研究などによって次々と明らかにされた。近年、Th17とこれに関連するサイトカイン群は、原因不明で難治性であった各種自己免疫疾患や炎症性疾患における予防および治療のターゲット分子として最も有望視されている。しかしながら、シェーグレン症候群の唾液腺におけるTh17の関与に関する報告は皆無であった。

(2) シェーグレン症候群とサイトカイン:

シェーグレン症候群は、唾液腺や涙腺といった外分泌腺へのリンパ球浸潤を特徴とする原因不明の自己免疫疾患で、慢性的な炎症によって腺組織は徐々に破壊され、唾液や涙液の分泌機能が低下する。これまでシェーグレン症候群の病態発現機序に関しては、Th1細胞に関連するサイトカインの関与を示唆する報告が多く、Th1型の免疫反応によってシェーグレン症候群は生じると考えられていた。実際、Th1の分化に関連する炎症性サイトカインであるIL-18は、シェーグレン症候群患者の血清中濃度が優位に上昇することが以前より報告されており、IL-18がシェーグレン症候群の病態発現に関与するサイトカインであることが示唆されてきた。

このような背景から、シェーグレン症候群の唾液腺において、IL-18ならびにTh17が病態発現に関与しているのではないかと考えた。さらに、両者の間には何らかの相互関係があるという仮定のもと、これまでTh1関連疾患であると考えられてきたシェーグレン症候群が、Th1のみならずTh17

の関与によって病態が発症する、いわゆるTh17関連疾患であるという新しい視点からの病因解明をすすめるに至った。

2. 研究の目的

シェーグレン症候群の唾液腺における炎症性サイトカインおよびTh17に関するサイトカインの発現を解析することで、シェーグレン症候群におけるT細胞系免疫異常の詳細を解明し、シェーグレン症候群の病態発現機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

シェーグレン症候群患者(10名)および健康なボランティア(4名)、口腔乾燥症患者(10名)慢性GVHD(移植片対宿主病)患者(10名)から下唇小唾液腺組織を採取し実験試料として用いた。本研究は東北大学大学院歯学研究科研究倫理委員会の承認のもと遂行した。

(1) 下唇小唾液腺からの初代培養細胞の分離:

健康なボランティアから採取した下唇小唾液腺組織は、Collagenase(Wako)を用いて細胞分散処理を施したのちに、培養器としてcollagen-1コーティングした培養用フラスコ「スミロンセルタイト」(住友ベークライト)、培地として成長因子およびウシ血清を添加したKeratinocyte-SFM(Invitrogen)+5%FCSを用いて培養した。培養した細胞は、少なくとも1回の凍結および融解が可能であり再現性のある実験を行えるものと判断し、ヒト唾液腺由来細胞として*in vitro*の検討に用いた。

(2) シェーグレン症候群の下唇小唾液腺における免疫組織学的な検討:

対象者より採取した下唇小唾液腺組織はただちに凍結切片を作製し、免疫染色を行った。初めにIL-18およびIL-17の発現、次にIL-17とIFN- γ 、CD4、CD8の発現を二重染色によって検討した。

(3) ヒト唾液腺細胞株HSYにおけるIL-18およびIL-17の相互作用の検討:

HSYを一晩培養したのち、recombinant IL-18(0, 1, 10ng/ml)およびrecombinant IL-17(0, 1, 10, 100ng/ml)を培地に添加し培養した。24時間後に培養上清を回収し、上清中に含まれるIL-6およびIL-8の濃度

を ELISA 法 (Human IL-6 OptEIA ELISA kit, BD Biosciences) (Human IL-8 OptEIA ELISA kit, BD Biosciences) を用いて測定した。

(4) ヒト唾液腺由来細胞における IL-18 および IL-17 の相互作用の検討：

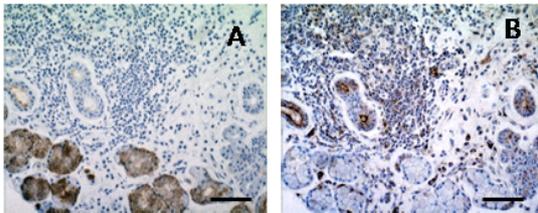
研究方法 (1) によって得られたヒト唾液腺由来細胞を用いて、研究方法 (3) と同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) シェーグレン症候群の下唇小唾液腺における免疫組織学的な検討

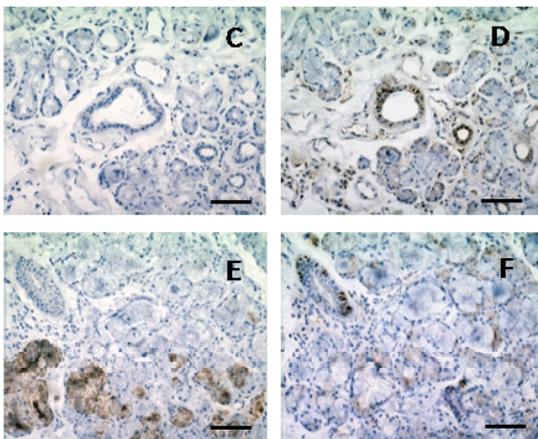
①下唇小唾液腺における IL-17 および IL-18 の発現：

図 1 に示すように、IL-18 はシェーグレン症候群患者の唾液腺の腺房細胞および導管内に (図 1 A)、IL-17 は導管周囲への浸潤細胞および導管上皮細胞に明瞭に発現していた (図 1 B)。

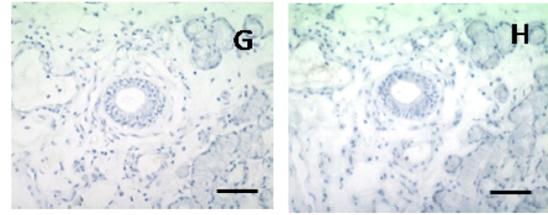


(図 1) Bars: 100 μ m

比較対照群の健康なボランティア、唾液腺の導管周囲へのリンパ球浸潤を認めない口腔乾燥症患者、同じく口腔乾燥を呈する慢性 GVHD 患者における下唇小唾液腺では、シェーグレン症候群患者の唾液腺にみられるような IL-18 と IL-17 の著明な発現は認められなかった (図 2 C, E, G) (図 2 D, F, H)。

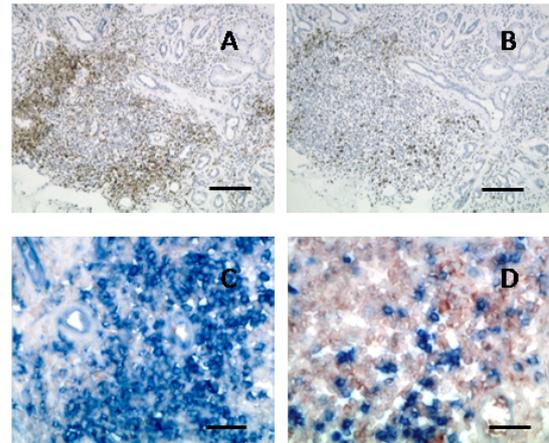


(図 2) Bars: 100 μ m



②シェーグレン症候群の下唇小唾液腺において IL-17 を発現する浸潤細胞のリンパ球サブセットの検討：

図 3 に示すように、シェーグレン症候群患者の唾液腺にみられる浸潤細胞は CD4⁺T 細胞が主体であり (図 3 A)、CD8⁺T 細胞もわずかに認められた (図 3 B)。さらに IL-17 を発現する浸潤細胞の大多数は CD4⁺T 細胞であり (図 3 C)、わずかではあるが CD8⁺T 細胞にも IL-17 の発現を認めた (図 3 D)。これらの結果は、シェーグレン症候群患者の唾液腺における浸潤細胞の主体は Th17 細胞であり、シェーグレン症候群の病態発現には Th17 細胞が重要な役割を担っている可能性を示唆している。



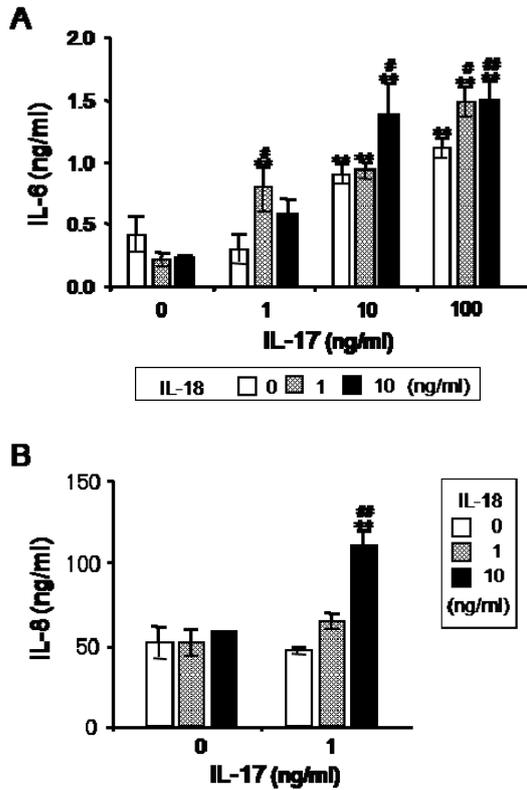
(図 3) Bars: 上段 200 μ m, 下段 50 μ m

(2) ヒト唾液腺細胞株 HSY およびヒト唾液腺由来細胞を用いた *in vitro* の検討

①ヒト唾液腺細胞株 HSY における IL-17 および IL-18 の相互作用：

IL-18 および IL-17 刺激をした場合の唾液腺細胞株 HSY からの IL-6、IL-8 の産生誘導を解析した。本細胞には IL-18 および IL-17 のレセプターが発現していることはすでに明らかにしている。図 4 に示すように、IL-18 単独では高濃度刺激でも HSY からの IL-6 の産生は誘導されず、IL-17 単独ではある濃度以上で IL-6 および IL-8 の産生が誘導された。IL-18 が低濃度でも存在

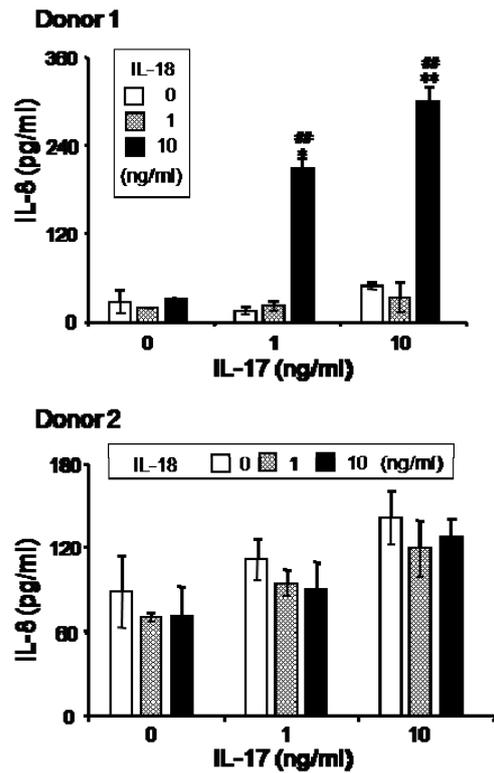
する場合には、IL-17 が低濃度でも IL-6 および IL-8 の産生がみられ、その量は IL-18 および IL-17 の濃度依存的に相乗的に増加した (図 4 A, B)。この結果は、IL-18 は IL-17 による炎症性サイトカインとケモカインの産生誘導を増強することを示唆している。



(図 4)

②ヒト唾液腺由来細胞における IL-18 および IL-17 の相互作用 :

IL-18 および IL-17 刺激をした場合のヒト唾液腺由来細胞からの IL-6、IL-8 の産生誘導を解析した。図 5 に示すように、ドナーによって 2 通りの結果を示した。IL-18 と IL-17 で共刺激することによって、すべてのヒト唾液腺由来細胞からの IL-8 産生は増加傾向を示したが、IL-18 が IL-17 の IL-8 産生を増強させたドナー 1 と、IL-17 と IL-18 の間に相乗関係がみられないドナー 2 があった (図 5)。このことはシェーグレン症候群の唾液腺に発現する IL-18 が、浸潤する Th17 から産生された IL-17 と共同して炎症メディエーターの産生を誘導し病態発現に重要な役割を果たしていることを示唆しているが、ドナーによって結果が異なる原因についてさらなる検討が必要である。



IL-6 は極めて多面性のあるサイトカインであり、炎症誘発効果によって炎症制御の主たる役割を担う、TNF- α と並ぶ生物学的製剤のターゲット分子として重要である。またケモカインである IL-8 は、好中球を活性化させ炎症部位への T 細胞と好中球の遊走を惹起する。唾液腺細胞から IL-6 と IL-8 の分泌を促す IL-18 と IL-17 の協調作用は、炎症だけでなく Th17 細胞の誘導をも引き起こす可能性がある。本研究では、シェーグレン症候群の病態発現には Th1 細胞のみならず Th17 細胞も関与していることを明らかにした。すなわち、IL-18 および IL-17、ならびに Th17 細胞の分化および増殖に関連するサイトカイン分子などがシェーグレン症候群の治療上のターゲットとなり得ることが示唆された。

本研究の成果は、シェーグレン症候群の予防および治療における新しいターゲット分子を提言した点で意義がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. 酒井梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二、
シェーグレン症候群におけるサイトカイン異常、
リウマチ科、査読無、42(2)巻、2009年、
211-216

2. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S,
Identification of IL-18 and Th17 Cells in Salivary Glands of Patients with Sjogren's Syndrome, and Amplification of IL-17-Mediated Secretion of Inflammatory Cytokines from Salivary Gland Cells by IL-18, Journal of Immunology. 査読有、181巻、2008年、2898-2906

[学会発表] (計2件)

1. Azusa Sakai, Yumiko Sugawara, Toshinobu Kuroishi, Takashi Sasano, Shunji Sugawara,
Function of IL-18 and Th17 in salivary gland of the patient with Sjogren's syndrome
10th International Symposium on Sjogren's Syndrome,
2009年10月2日、France (Brest)

2. 酒井梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二、
シェーグレン症候群の唾液腺におけるIL-18とTh17の関与、
第18回日本口腔粘膜学会、
2008年9月20日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 梓 (SAKAI AZUSA)
東北大学・病院・医員
研究者番号：90463778

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：